

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-079626

(43)Date of publication of application : 18.03.2003

(51)Int.Cl.

A61B 8/06
A61B 5/0285

(21)Application number : 2001-273303

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY
CORP
TOKYOTO IGAKU KENKYU KIKO

(22)Date of filing : 10.09.2001

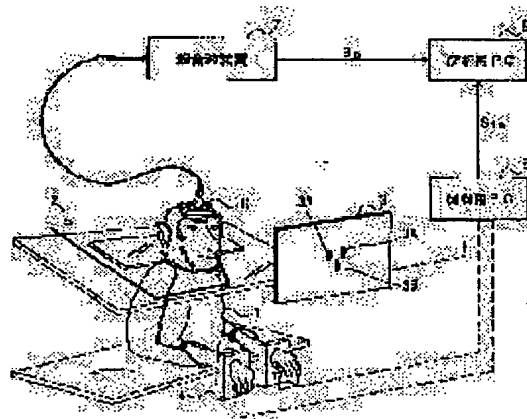
(72)Inventor : HATANAKA NOBUHIKO
TOKUNO HIRONOBU
TAKADA MASAHIKO
NANBU ATSUSHI

(54) BRAIN FUNCTION ANALYSIS METHOD AND SYSTEM BASED ON ULTRASONIC DOPPLER METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a brain function analysis method and system based on an ultrasonic Doppler method by which one can observe a relation between a sensory stimulus (input) or a behavior (output) and a local brain activity (internal state) and dynamic time changes of their interactions.

SOLUTION: The skull is partially removed and the velocity of bloodstream in tiny arteries of the brain is measured from the surface of the dura mater with an ultrasonic probe 6. Doppler sound data are turned into a waveform with a time-frequency analyzer, and peak values in all phases of the waveforms are traced. A plurality of results of task trials is added, percent changes of peak values at rest and at work are computed, and on the basis of data obtained, percent changes of bloodstream are plotted in color on a tomogram, and the tomogram is three-dimensionally reconstructed, using computer graphics software to obtain a functional image of the brain.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-79626

(P2003-79626A)

(43)公開日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(51) InLCl'

識別記号

A 6 1 B 8/06
5/0285

F 1

テーク・アウェイ (参考)

A 6 1 B 8/06

4C017

5/02

340H

4 C 3 0 1

4C601

審査請求 未請求 請求項の数2 OL (全 6 頁)

(21)出願番号 特願2001-273303(P2001-273303)

(71)出願人 396020800

科學技術振興事業團

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(22)出願日 平成13年9月10日(2001.9.10)

(71)出願人 591063394

財団法人 東京都医学研究機構

東京都新宿区西新宿二丁目8番1号

(72) 究明者 畑中 伸彦

東京都国分寺市泉町3-8-6 ザミルキ
ーウェイ205

(74) 代理人 100089635

介理仁 清水 守

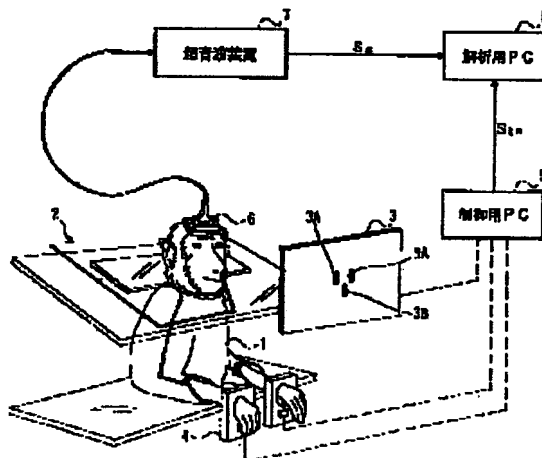
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 超音波ドプラー法を応用した脳機能解析方法及びその脳機能解析システム

(57) 【要約】

【課題】 感覚刺激(入力)や行動(出力)と局所脳活動(内部状態)の間の関係や、それらの相互作用のダイナミクスを時間変化を観察することができる超音波ドプラー法を応用した脳機能解析方法及び脳機能解析システムを提供する。

【解決手段】 頸蓋骨を部分的に除去し、硬膜表面から超音波プローブにより脳の微小動脈における血流速度を測定し、ドプラー音データを時間、周波数分析器を用いて波形化し、この波形化された各位相のピーク値をトレースし、複数の課題トライアルの結果を加算し、安静時と活動時におけるピーク値の変化率を算出し、得られたデータに基づき、断層画像上に血流変化の割合をカラーマップとし、前記断層画像をコンピュータグラフィックソフトを用いて三次元再構築し、脳の機能画像を得る。



【特許請求の範囲】

【請求項1】(a) 頭蓋骨を部分的に除去し、硬膜表面から超音波プローブにより脳の微小動脈における血流速度を測定し、(b) ドプラー音データを時間一周波数分析器を用いて波形化し、(c) 該波形化された各位相のピーク値をトレースし、(d) 複数のトライアルの結果を加算し、(e) 平静時と活動時におけるピーク値の変化率を算出し、(f) 得られたデータに基づき、断層画像上に血流変化の割合をカラーマップとし、(g) 前記断層画像をコンピュータグラフィックソフトを用いて三次元再構築し、脳の機能画像を得ることを特徴とする超音波ドプラー法を応用した脳機能解析方法。

【請求項2】(a) 被検体の脳に対応する頭蓋骨切除部に配置される超音波プローブと、(b) 前記被検体を所定の位置に拘束するための定位装置と、(c) 前記被検体へ指示を与える手段と、(d) 前記指示に反応して信号を出力する入力手段と、(e) 前記被検体へ指示を出し、入力手段からの信号を取り込む課題制御装置と、

(f) 前記超音波プローブからの出力信号を取り込む超音波装置と、(g) 該超音波装置からの出力信号と、前記課題制御装置からの課題イベント信号とを取り込む脳機能データ解析器とを具備することを特徴とする超音波ドプラー法を応用した脳機能解析システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、超音波ドプラー法を応用した脳機能解析方法及びその脳機能解析システムに関するものである。

【0002】

【従来技術】脳機能に応じて変化する血流や代謝を画像として捉える方法は以前より研究され、いくつもの測定方法が開発され研究されてきた。特に、研究の進んでいるものにfMRI（機能的核磁気共鳴画像装置）、PET（陽電子放射型断層撮影装置）〔文献1：Med Phys 1987 Nov;14(6):p.903~913、文献2：Neurosci Lett 1984, Jun 27;18(2):p.115~120〕が挙げられる。これらは脳の活動が活動により代謝が上昇したところを見いだすことができた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】脳機能の解析には、出来るだけ広範囲で時間的、空間的分解能が高いものが理想的である。なぜなら、高等な動物を用いた方が、より人間へフィードバックしやすい研究となるが、高等な複雑な脳を持つ動物ほどその脳の個体差が大きく、被検体相対間の比較が厳密性を欠くというジレンマがある。そのため、脳の全体的な位置関係から被検体相対間の比較を行うことが必要であるからである。

【0004】しかしながら、上記のfMRI、PETのような方法では、脳全体を観察できるという利点はある

が、時間分解能が低く、このためによる作業を行う前と後のような評価しかできなかった。最近fMRIでは、時間分解能を向上させるための試みがなされているが

〔文献3：J Comput Assist Tomogr 2001 Jan;25(1):p.113~120〕、この方法だと空間分解能が著しく低下してしまう。現在まで、覚醒下の被検体を1mm単位での空間分解能を持ち、0.1秒単位での時間分解能を持つ脳機能測定システムはなかった。

【0005】さらに、両方法とも撮像時間が長く、運動課題を実行中の被検体の脳機能解析には体動（体が動くこと）の影響が完全に除けるかどうかの疑問も残る。また、システム自体も非常に高価で、またメンテナンスにかかる費用も高額となる。

【0006】よって、脳研究の今後の飛躍のためには、広範囲な観察ができ、十分な空間的、時間的分解能を持つ新しい解析システムが求められていた。

【0007】本発明は、上記状況に鑑みて、感覚刺激（入力）や行動（出力）と局所脳活動（内部状態）の関係や、それらの相互作用のダイナミクスを時間変化を観察することができる超音波ドプラー法を応用した脳機能解析方法及び脳機能解析システムを提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記目的を達成するために、

〔1〕超音波ドプラー法を応用した脳機能解析方法において、頭蓋骨を部分的に除去し、硬膜表面から超音波プローブにより脳の微小動脈における血流速度を測定し、ドプラー音データを時間一周波数分析器を用いて波形化し、この波形化された各位相のピーク値をトレースし、複数のトライアルの結果を加算し、平静時と活動時におけるピーク値の変化率を算出し、得られたデータに基づき、断層画像上に血流変化の割合をカラーマップとし、前記断層画像をコンピュータグラフィックソフトを用いて三次元再構築し、脳の機能画像を得ることを特徴とする。

【0009】〔2〕超音波ドプラー法を応用した脳機能解析システムにおいて、被検体の脳に対応する頭蓋骨切除部に配置される超音波プローブと、前記被検体を所定の位置に拘束するための定位装置と、前記被検体へ指示を与える手段と、前記指示に反応して信号を出力する入力手段と、前記被検体へ指示を出し、入力手段からの信号を取り込む課題制御装置と、前記超音波プローブからの出力信号を取り込む超音波装置と、この超音波装置からの出力信号と、前記課題制御装置からの課題イベント信号とを取り込む脳機能データ解析器とを具備することを特徴とする。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について

て詳細に説明する。

【0011】図1は本発明の実施例を示す脳機能解析システムの模式図である。

【0012】この図において、1は被検体としてのサル、2はそのサル（被検体）1を所定の位置に拘束するための定位装置、3は前記被検体1へ指示を与える手段としての表示パネル、4は前記指示に反応して信号を出力するための入力装置（キースイッチ）、5は前記被検体1への課題を与えるための制御用コンピュータ（制御用PC）、6は超音波プローブ、7は超音波装置、8は超音波装置7からの出力信号と、前記制御用PC5からの課題イベント信号とを取り込む脳機能データ解析用コンピュータ（解析用PC）である。

【0013】その脳機能データ解析用PC8は、図2（a）に示すように、超音波装置7からの出力であるサウンド信号を取込み、図2（b）に示すように、時間周波数解析を行い、図2（c）に示すように、その位相波形のピーク値のトレースを行い、図2（d）に示すように、複数の試行の結果（ここでは20試行から50試行）を加算し、平準時と活動時におけるピーク値の変化率を算出する。なお、一連のサルのボタン押し行動を一試行と述べている。

【0014】以下、その脳機能データ解析について図1及び図2を参照しながら詳細に説明する。

【0015】実験には、3頭のニホンザル（メス、体重4、8〜9、6kg）を用いた。サルはモンキーチェアに座ってられるようにトレーニングされ、続いて本格的な運動課題のトレーニングを行った。

【0016】使用した運動課題は、遅延期付き右手、左手、両手の3種類のボタン押し分別課題であった。

【0017】サル1の前方10cmのところに表示パネル5があり、2つの手がかり刺激用LED3Aと1つの行動開始刺激用LED3Bとの合計3つのLEDが逆三角形に並んでいる。各LEDの間隔は2.5cmで、課題提供中サルが目を動かさずによいように設計されている。左右のLED3Aが片側だけ点灯した場合はそれぞれ左右のどちらかのキースイッチ1を押させる手がかり刺激となり、手がかり刺激用LED3Aの両方が点灯すれば、両方のキースイッチ4を押す手がかり刺激となっている。運動課題中に両上肢遠位のみの運動にとどめるため、肩、背中、上腕肘を固定する固定装置をモンキーチェア上に作製し使用した。

【0018】キースイッチ1はストロークが1.6mmのプッシュスイッチでモンキーチェア上のサル固定装置の先端にサルの休憩と平行に取り付けた。

【0019】運動課題を時間軸上で説明すると、手がかり刺激が2秒間点灯した後、ランダムな遅延期間の後に、LEDが点灯する（図3及び図4参照、詳細は後述）。

【0020】サルが正しいボタンを行動開始刺激の点灯

から1秒以内に押したとき、報酬としてフルーツジュースがサルに与えられる。両手でのボタン押し時の左右のタイミングのずれは200ms以内で許容される。行動開始刺激の前にサルがボタンを押した場合、サルが指示されているのと違うボタンを押した場合、サルがどのボタンも押さなかった場合、サルに誤答を知らせる電子ベル音を鳴らせた。

【0021】1期目は、3種類の分別において各トライアルがランダムに提示されても90%以上の成功率に達したときに左右の分別を覚えたと判断し、脳定位固定装置にセットするための手術を行った。

【0022】2期目、3期目は学習による変化を観察するために成功率が90%になる前に手術を行った。塩酸ケタミンとキシラジンの筋肉内注射をし、その後ペントバルビタールを静脈内注射し、全身麻酔を行った。頭蓋骨を広く露出し、ステンレス製のネジを埋めてアンカーとし、10%クエン酸で表面処理を行い、4 META系の接着性レジンを用いて骨との接着性を増した後、アクリルレジンで完全に覆った。さらにその上に頭部固定用の2つのパイプをステレオ固定面が再現できるように10cmの間隔で前後に平行に装着した。

【0023】術後サルが回復した後、サルが問題なく運動課題を施すのを確認し、超音波ドップラー法でデータを取るために頭蓋骨の上部1/3に渡る部分除去（およそ6cm×6cm、サル頭蓋骨の上部1/3）を行った。除去後同部はアクリルレジンとゲルリン樹脂にて方形のチャンバーをつくった。疼痛緩和のための鎮痛剤と感染予防のために抗菌剤の投与を行った。

【0024】超音波ドップラー法での超音波プローブ6によるデータ採取は、ステレオ装置用マニピュレーターに固定用アタッチメントを製作し、ステレオ面が出せるようにして行った。これにより再現性が確保され、同じ部位での経時的、経口的な測定が可能となった。

【0025】さらに、得たデータがキースイッチ1を押す上肢遠位屈伸筋群だけに限局されているのを確認するために運動課題施行中に表面電極を用い、左右上肢遠位の屈筋群、伸筋群、上肢近位屈筋群、伸筋群、広背筋、前鋳筋、脊髄周囲の筋群を測定した。得た筋電図は、運動課題のイベントに合わせて加算し問題ないことを確認した。

【0026】超音波装置7にはGE medical社製LOGIQ 700 MRを使用した。まず、チャンバー内に生理食塩水を満たし、マニピュレーターに装着した超音波プローブ6をチャンバー内に挿入し、前額断面画像を得る。断面像はチャンバーの前縁を利用して毎回同じ面が出るようにした。また、超音波ドップラー法での血流情報は、その血管の走行方向に依存して得られる強度を変化させるため、垂直に、あるいは補正運動野（SMA）の場合は、データを採取する半球の反対側へ10度傾けて固定された。

【0027】通常の全視野の観察には、プローブからの超音波出力は13MHzを使用した。高周波数での観察は浅いところでは空間分解能が上昇し、観察精度が上がるが、深部まで到達しにくい性質がある。今回は大脳皮質を観察したため装置の持つ最高周波数を使用した。

【0028】カラーフロー表示モードでデータを採取する領域を決定するが、このときの超音波プローブからの周波数は7.5MHzで、時間分解能を上げるためにFrame averageは使用しなかった。装置上で脳表から脳皮質内に入る微小血管を観察できるためこの操作は簡便であった。

【0029】データの採取はハワードフラーモードで行った。LOGIQ 700 MRではパワードフラーモード時に空間分解能を上げるため2次元アレイ発信を行う。このときの超音波プローブからの周波数は6.2MHzで固定されている。wall filterは、v scale ratio 1 4モードで16Hzを使用し、Velocity scaleは適宜調整したが、皮質内の微小血管の流速値は低いので概ね最も低い3cm/sを使用した。

【0030】そこで、超音波装置7であるLOGIQ 700 MRより出る音信号〔図2(a)参照〕を解析用PC 8にA/Dボードを使用して取込み、JTF A解析〔図2(b)参照〕し、変化が明確になる閾値で切り出した曲線を一施行のデータとした。解析した曲線は拍動性の流速を示すデータである。脳皮質の酸素要求度は、一回の拍動の最高値(Vmax)に示される(doppel J Neurosci methods 1997 75 147 54 Neuroimage 1998 7 1p12 S118)ため、得られた曲線のピーク値をプログラム上でトレース〔図2(c)参照〕した。さらに、より特徴を明確にし、ノイズを軽減するために同じ閾値で解析し、トレースした曲線を課題イベントにあわせて加算した。さらに、他の領域からのデータと比較するために、インストラクション信号が出る前の0.5秒間をコントロールピリオドとしてその平均値に対する増減の割合を時間軸上のすべての点で算出した〔図2(d)参照〕。

【0031】本発明の脳機能解析システムを用いて運動課題の進行中のサルの大脳皮質から血流変化を記録することを行った。つまり、遅延付き両手ボタン押し分別運動課題をサルに訓練し、一次運動野、一次体性感覚野、補足運動野、運動前野背側部、および運動前野腹側部で課題に反応した血流変化を超音波ドプラー法により解析した。

【0032】図3は本発明の実施例を示す脳機能解析システムによる各運動領域におけるL(左)ーR(右)ーB(両方)判別課題における両方(左、右)施行時のコントロール期間に対する血流速の増加量(Vmax)を示す図であり、図3(a)にはその一次運動野、図3

(b)にはその一次体性感覚野、図3(c)には補足運動野、図3(d)にはその運動前野背側部、図3(e)にはその運動前野腹側部のそれぞれの血流速の増加量(Vmax)を示している。

【0033】図4は本発明の実施例を示す脳機能解析システムによる各運動領域におけるL(左)ーR(右)ーB(両方)判別課題における同側(左)施行時のコントロール期間に対する血流速の増加量(Vmax)を示す図であり、図4(a)にはその一次運動野、図4(b)にはその一次体性感覚野、図4(c)には補足運動野、図4(d)にはその運動前野背側部、図4(e)にはその運動前野腹側部のそれぞれの血流速の増加量(Vmax)を示している。

【0034】(1)一次運動野では運動実行に関連した血流増加が反対側性及び両側性に認められた。

【0035】(2)補足運動野では手がかり刺激と運動実行の両方に関連した相性の血流増加が同側性、反対側性、及び両側性に認められた。

【0036】(3)運動前野では、課題に反応した血流変化が少なく、また、一次体性感覚野における血流増加は一次運動野のそれに比べて持続時間が長かった。

【0037】(4)補足運動野で学習初期にみとめられた手がかり刺激に関連した血流増加は、学習成立時には減弱した。

【0038】(5)一日のうちで遅延付き分別課題から単純な遅延なし課題に移行させた場合にも、補足運動野で認められる手がかり刺激に関連した血流増加は徐々に減弱、消失した。

【0039】これらの図から明らかのように、本発明によれば、大脳皮質から血流速を感覚刺激(入力)や行動(出力)と局所脳活動(内部状態)の間の関係や、それらの相互作用のダイナミックな時間変化を観察することができた。

【0040】なお、本発明は上記実施例に限定されるものではなく、本発明の趣旨に基づいて種々の変形が可能であり、これらを本発明の範囲から排除するものではない。

【0041】

【発明の効果】以上、詳細に説明したように、本発明によれば、以下のような効果を奏することができる。

【0042】(A)超音波ドプラー法を応用して脳血流を直接モニターすることにより、脳の機能的イメージングを行うことができる。

【0043】(B)超音波ドプラー機能を備えた超音波画像診断装置を用いて、脳血流の速度変化を直接モニターすることにより、従来の「MRI法」や「PET法」に比べて、より高い時間分解能と空間分解能を有するだけでなく、コスト面や操作性、汎用性の点からも優れた脳機能解析システムを得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例を示す脳機能解析システムの模式図である。

【図2】本発明の実施例を示す脳機能解析システムの各部の信号波形を示す図である。

【図3】本発明の実施例を示す脳機能解析システムによる各運動領域におけるL（左）-R（右）-B（両方）判別課題における両方（左、右）施行時のコントロール期間に対する血流速の増加量（ V_{max} ）を示す図である。

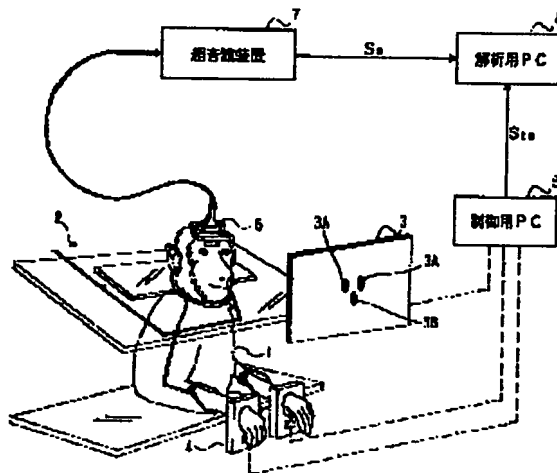
【図4】本発明の実施例を示す脳機能解析システムによる各運動領域におけるL（左）-R（右）-B（両方）

判別課題における両方（左）施行時のコントロール期間に対する血流速の増加量（ V_{max} ）を示す図である。

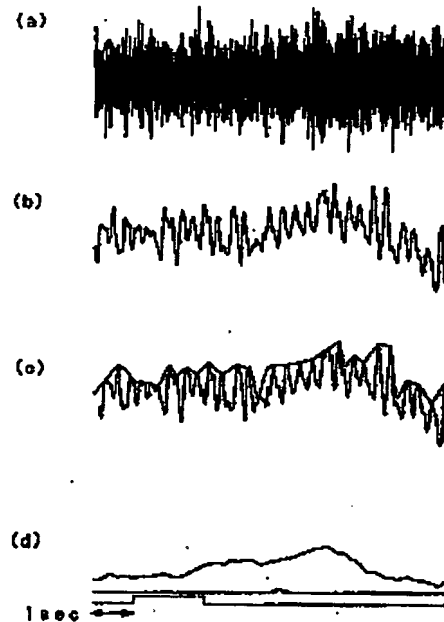
【符号の説明】

- 1 被検体としてのサル
- 2 定位装置
- 3 表示パネル
- 4 入力装置（キースイッチ）
- 5 制御用コンピュータ（制御用PC）
- 6 超音波プローブ
- 7 超音波装置
- 8 脳機能データ解析用コンピュータ（解析用PC）

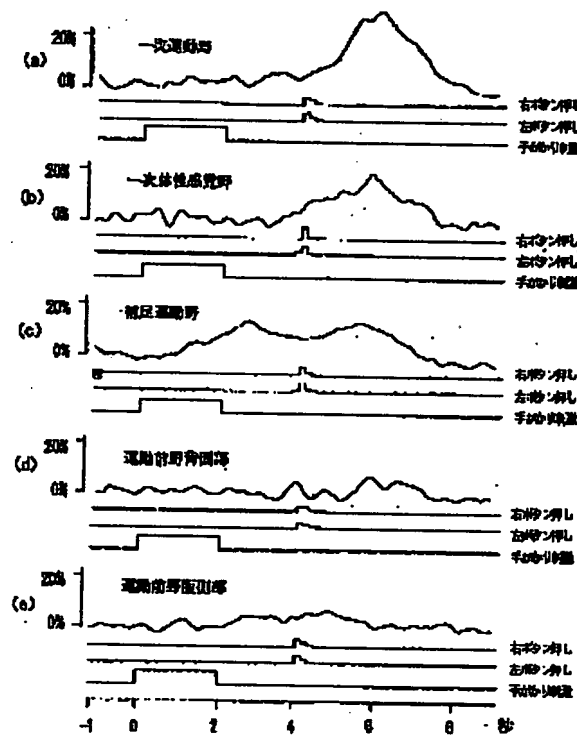
【図1】



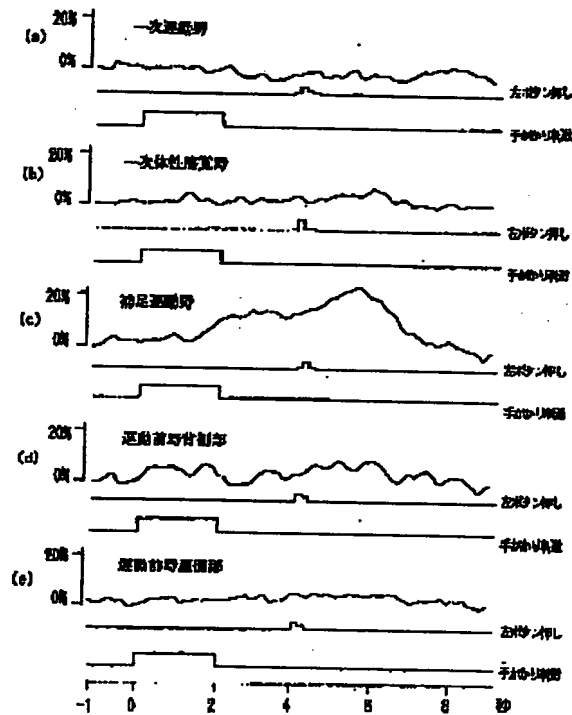
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 徳野 博信
東京都国立市東1-13-57
(72)発明者 高田 昌彦
東京都目黒区市北町2-31-16
(72)発明者 南部 篤
東京都目黒区市南藤2-9-23 メゾン竹
内101

ドクターズ(参考) 4C017 AA11 AB10 AC23
4C301 CC01 DD01 DD02 EE11 JH23
JD29 KK02 KK12 KK16 KK22
4C601 DD03 DE01 EE09 JH34 JD35
JH36 JH45 JC25 KK02 KK18
KK19 KK21 KK23 KK24

<原 著>

虚血性脳浮腫の実験的研究

第1報 ラットを用いた血流再開可能な脳梗塞モデル

小泉 仁一¹⁾²⁾ 吉田 洋二¹⁾ 中沢 貞二¹⁾ 大根田玄寿³⁾

要旨：血流再開可能なラット脳梗塞モデルを開発し、虚血巣内の神経組織や血管壁の光顕的变化ならびに血流再開による組織像の修飾、血流の再開前後における脳含水量の変化を検討した。STD Wistar 雄ラットの右総頸動脈より糸つき塞栓を挿入し、右中大脳動脈入口部を閉塞、この塞栓を一定時間留置後、抜去し血流を再開した。閉塞後、脳腫脹は経時的に増悪し、対照群の含水量77.62%に対し、12時間閉塞後のそれは79.48%となった。閉塞後32時間で全例が死亡した。死亡時における梗塞巣は側頭・頭頂葉、基底核および視床下核の一部に再現性よく認められた。また、血流の再開により含水量は永久閉塞群に比し有意に増加し、その程度は閉塞時間の長さに平行した。組織学的には、血流の再開により梗塞巣の海綿状状態は増強し、毛細血管からの出血、梗塞巣への白血球浸潤も加わっていた。

Key words: experimental cerebral infarction, ischemic brain edema, re-circulation
(脳卒中8:1-8, 1986)

はじめに

ヒトの脳塞栓症の急性期には、著明な脳浮腫と脳内血管の重篤な病変、すなわち毛細血管や小動脈の類線維素性変性、小動静脈壁への好中球浸潤、水腫、破綻性ないし漏出性出血などが見られる。これらの血管病変は脳浮腫の成因として、また出血性梗塞の際の出血の基礎病変として極めて重要である¹⁾。この著明な脳浮腫の発生を抑え、出血性梗塞を防止するためには、これらの血管病変の成り立ちを明らかにする必要がある。また、脳梗塞の急性期に血流が再開すると、脳浮腫が著しく増悪することもよく知られた事実であるが、虚血の根本的な治療法は血流の再開であると考えられるので、血流の再開による脳浮腫の増悪の機序を解明する必要を痛感する。これらの研究目的のためには、比較的容易な操作で、再現性のよい、血流の再開可能な脳梗塞モデルが必要である。従来、様々な脳梗塞モデルが開発されてきたが^{2)~7)}、脳組織や血管に手術的侵襲が加えられたり、梗塞巣の大きさや部位の再現性が不十分であったり、血流の再開が不可能であったりして、必ずしも本研究の目的に十分なもので

はなかった。

われわれは、本研究の目的に十分利用し得る脳梗塞モデルをWistar系ラットに作ることができたので、その作製法とそれを用いた若干の実験成績を報告する。

実験材料と方法

1. ラットの内頸動脈および脳底部諸動脈の解剖学的検討

STD Wistar 系雄ラット(10週齢、体重約230g、静岡県実験動物農業協同組合)をネンブタール麻酔下を開腹し、腹部大動脈より5Fr 静脈カテーテル(アトムKK)を心方向に挿入固定し、両頸静脈を切開後、35~37℃の生理的食塩水を100~120mmHgの圧にて灌流した。さらに、2.5% glutaraldehyde-0.1M phosphate buffer (pH 7.4)を2~3分間灌流し頭蓋部の動脈を軽く固定した。次に、あらかじめ調合した液状の樹脂(メルコックス、日本バイリーンKK)を同一の圧にて注入が困難になるまで注入し、その動物を室温に20~30分間置き重合せしめた。脳を取り出し15~20% KOH水溶液中に浸漬し、組織を溶解して樹脂鋳型標本を作製した。頭頸部の血管鋳型標本も同様にKOH水溶液中に浸漬し、軟部組織を除去して作製した。

1) 山梨医科大学第1病理

2) 山梨県立中央病院脳神経外科

3) (財)老年病研究所

この鋳型標本を用いて、頭頸部の動脈の走行、分岐の状態を観察し、頸動脈分岐部より中大脳動脈起始部までの内頸動脈の長さ、中大脳動脈起始部付近の諸動脈の内径を測定した。

2. 塞栓の作製

動脈鋳型標本の実測値をもとに、塞栓を作製した(Fig. 1). すなわち、4-0外科用ナイロン糸の先端をアルコールランプにかざして直径0.2~0.3mmの球とし、それより近位側に向かって約5mmの範囲を、球の大きさを目安として歯科用印象剤(キシントブレイン, バイエル日本歯科KK)で被覆し、直径0.2~0.3mm, 長さ約5mmの糸つき塞栓(全長16mm)を作製した。また、ナイロン糸近位端も同様に熱処理を加え球状とし、塞栓挿入時のストッパーとして、あるいは血流の再開通のための栓子の抜去にも操作がしやすいようにした。

3. 脳梗塞モデルの作製

1) 永久閉塞モデル

STD Wistar 系雄ラット(9~10週齢, 体重200~240g) 60頭をネブタール(40mg/kg)麻酔下に、自然呼吸のまま固定器に固定し、頸部正中切開を加え、迷走神経の保存に留意しつつ、右頸動脈分岐部に達した。右頸動脈分岐部を中心に、総頸動脈および外頸動脈を周囲結合組織より剝離し、それぞれ、6-0絹糸にて結紮、さらに、内頸動脈起始部に糸をかけ塞栓挿入後の結紮・固定にそなえた。次いで、総頸動脈を切開し、同部より塞栓を内頸動脈に向けて約15~16mm挿入、塞栓のナイロン糸近位端を前述の絹糸で内頸動脈に結紮・固定した。以上の操作により、塞栓の先端は中大脳動脈分岐部を越えて、前大脳動脈内に約1~2mm入り、塞栓の体部で中大脳動脈入口を閉塞した(Fig. 1, 2)。

これらの動物について、塞栓挿入後の死亡時間と形成された脳梗塞の組織学的検討を行い、さらに、健常対照ラットと塞栓挿入後2, 4, 6, 8, 12時間後の梗塞ラットをそれぞれ4頭ずつ、腹大動脈より放血屠殺し、脳含水量を測定した。

2) 再開通モデル

中大脳動脈を閉塞した塞栓を一定時間留置後、エーテル麻酔下で抜き去り、血流の再開通を試みた。ただし、このモデルでの血流の再開は、右総頸動脈が結紮されているため、左内頸動脈および椎骨・脳底動脈より前・後交通動脈を介して行われるものと考えられる。各々4頭を一群とし、2, 4, 6時間閉塞後に血流を再

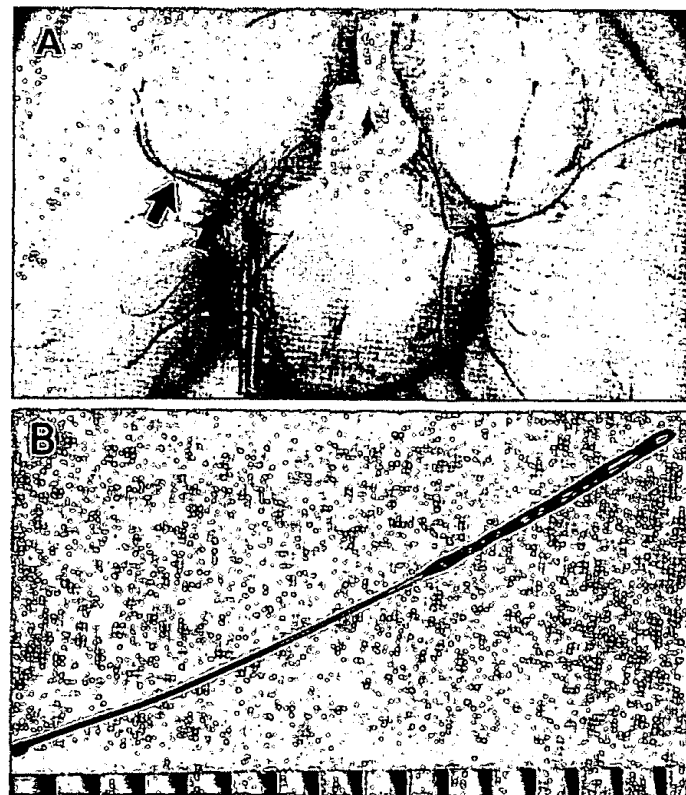


Fig. 1 A: Inserted embolus into the right internal carotid artery resulting in blocking blood flow into the middle cerebral artery (arrow). B: Silicon rubber cylinder with nylon thread.

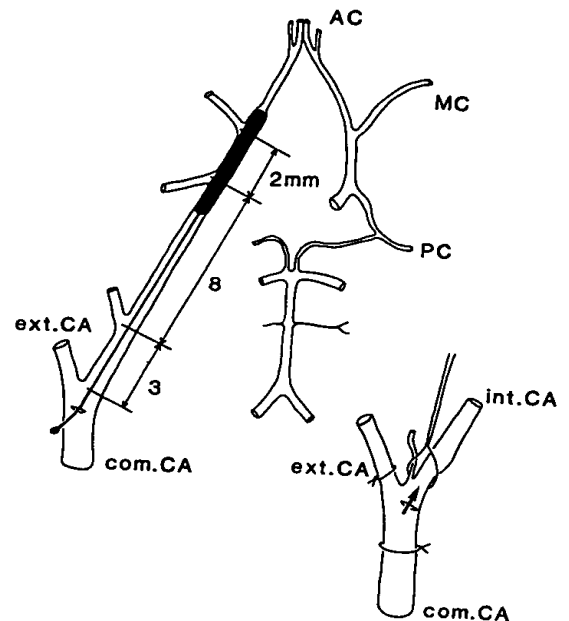


Fig. 2 Schematic explanation of embolization and the operation procedure.

開して2時間後に屠殺した12頭と、各々3頭を一群とし2, 4, 6時間閉塞後、偽手術を行ったが塞栓は抜去せず、その2時間後に屠殺した対照群9頭の合わせて21頭の脳含水量を測定した。

4. 脳含水量の測定

エーテル麻酔下に腹大動脈を切断して放血屠殺し、速やかに全脳（嗅脳および延髄にて切断）を摘出し、注意深く脳表の血液を取り除き湿重量を測定したのち、 -80°C にて48時間凍結した。次いで、真空凍結乾燥機（freeze dryer, 宮川科学資材）を用いて78時間乾燥し、乾燥重量を測定した。これより、 $\% \text{含水量} = [(\text{湿重量} - \text{乾燥重量}) \times 100 / \text{湿重量}]$ を算出し、比較検討した。

5. 組織標本の作製

組織標本作製のためのラットは、腹大動脈より放血屠殺後、直ちに全脳を摘出し、10%中性緩衝液加ホルマリン水で固定した。切り出した小組織片を型の如くパラフィン切片とし、HE, 燐タングステン酸ヘマトキシリン（PTAH）, luxol fast blue（LFB）染色を施した。また、一部の動物には、腹大動脈より5Fr 静脈カテーテルを胸部大動脈まで挿入、両頸静脈を開放し、ヘパリン（1,000IU/L）を加えた生食水100mlを灌流後、2.5% glutaraldehyde-0.1M phosphate buffer（pH 7.4）にて灌流固定し、パラフィン切片を作製して同様の染色を行った。

実験成績

1. 動脈鑄型標本の実測値

右総頸動脈より分岐した右内頸動脈は、分岐後2~3mmの部位で、A. pterygopalatinaを分岐したのち脳底に至る。左右の内頸動脈は、順次、後大脳動脈（fetal typeの後交通枝）、中大脳動脈を分岐し、視交叉部の眼窩底を正中溝に向う前大脳動脈に移行、左右の前大脳動脈が側々吻合状に前交通枝を形成していた。また、椎骨・脳底動脈は左右に上小脳動脈を分岐する部位で数本の穿通枝を分岐し、同部位より分岐する後交通動脈も認められる。頸部内頸動脈分岐部より中大脳動脈分岐部までの内頸動脈の長さは約13~14mmで、中大脳動脈分岐部付近の諸血管内径は、分岐前の内頸動脈が約0.3mm、前・中大脳動脈は共に約0.2mmであった（Fig. 2）。

2. 中大脳動脈起始部閉塞術の成功率および塞栓挿入後の死亡時間

永久閉塞群60頭中、塞栓が中大脳動脈起始部に認め

られ内腔を閉塞していたものは、55頭（91.6%）であった。塞栓が中大脳動脈起始部に認められなかった5頭の内訳は、塞栓がA. pterygopalatinaに迷入したものの2頭（3.3%）、塞栓先端が頸動脈管破裂口付近の内頸動脈でつかえていたもの1頭（1.6%）、総頸動脈より内頸動脈に塞栓が挿入できなかったもの2頭（3.3%）であった。キサントブレンが糸から脱落したものはなかった。

次に、中大脳動脈起始部を塞栓が閉塞していた26頭の死亡時間を検討したところ、術後9時間より死亡しはじめ、16時間以内に50%、24時間以内90%、32時間以内に26頭全例が死亡した（Fig. 3）。神経学的には、麻酔の覚醒期に旋回運動あるいは軽度の不全片麻痺を認めたこともあったが、無症状に経過することも多く、時に、全身痙攣を生ずることがあった。末期に近づくとき自発運動の低下が目立つようになり、死亡時には、すべての例に強直性の全身痙攣が認められた。

3. 脳梗塞の範囲

永久閉塞群で中大脳動脈起始部を塞栓が閉塞していた55頭中、脳含水量を測定した20頭を除く35頭について、大脳を組織学的に検索したところ、全例に脳梗塞が生じていた。このうち、塞栓挿入後の死亡時間を検討した26頭の動物では、脳梗塞の広がりほぼ等しく個体差は少なく、その範囲は側頭・頭頂葉、基底核、視床下核に及び、内頸動脈分枝および中大脳動脈領域全般にわたる広範なものであった（Fig. 4）。一方、塞栓が中大脳動脈起始部に認められなかった5頭には、脳梗塞は生じていなかった。

4. 脳含水量の経時的変化

健常対照ラット4頭の%含水量は、 $77.62 \pm 0.05\%$ であった。また、塞栓を挿入できずに総頸、外頸、内頸動脈を結紮し直ちに屠殺した2頭と術後2~12時間後の屠殺時に塞栓が迷入していた5頭、計7頭の%含水

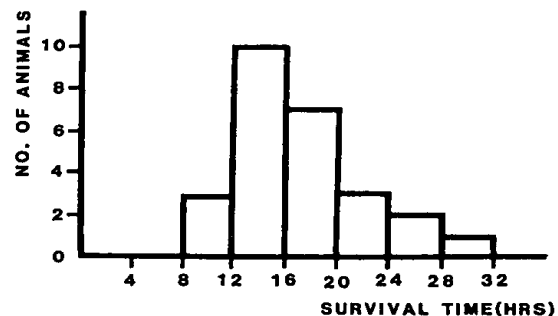


Fig. 3 Survival time of the animals received the operation.

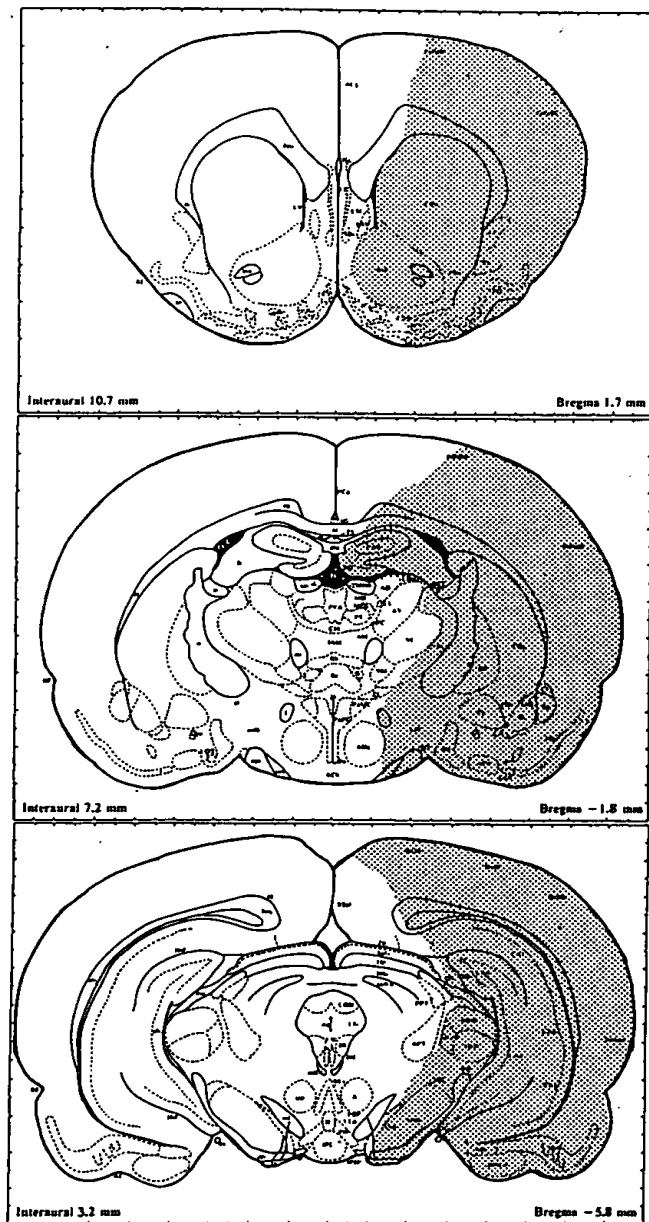


Fig. 4 Diagrammatical explanation of infarcted area.

量は、 $77.73 \pm 0.11\%$ であった (Fig. 5). 永久閉塞群では、%含水量は閉塞時間に比例して増加傾向を示し、2時間閉塞群では 78.19 ± 0.16 , 4時間 78.47 ± 0.07 , 6時間 78.85 ± 0.38 , 8時間 79.17 ± 0.14 , 12時間 79.48 ± 0.49 であった。また、中大脳動脈分岐部閉塞により死亡した6頭の%含水量は、 80.18 ± 0.21 であった (Fig. 5).

再開通群では同時間閉塞した永久閉塞群に比べ%含水量が高く、特に、4時間閉塞2時間再開通 (4+2H) と4時間永久閉塞 (4H) *, 6時間閉塞2時間再開通

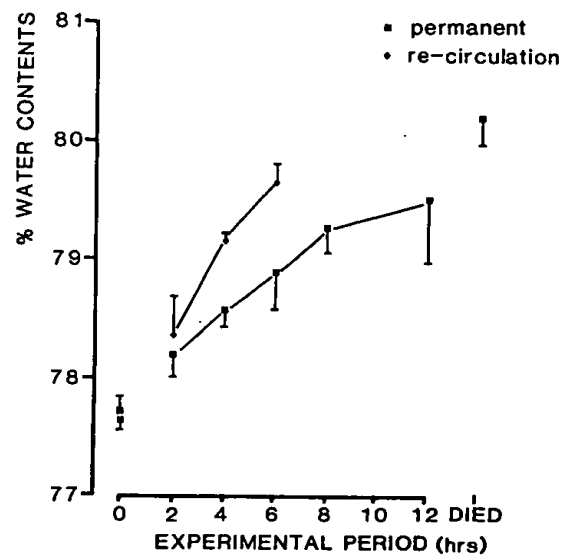


Fig. 5 Effect of recirculation into the infarcted area on water contents of the brains with embolization.

(6+2H) と6時間永久閉塞 (6H) **の間では%含水量の増加に有意の差 (* $p < 0.025$, ** $p < 0.05$) が認められた (Fig. 5). また、6+2Hでは、5頭中2頭が再開通2時間以内に死亡し、他の3頭も自発運動の著名な低下が見られた。

一方、対照群 (偽手術群) の%含水量は、2+2H, 78.69 ± 0.07 ; 4+2H, 78.91 ± 0.20 ; 6+2H, 79.30 ± 0.23 で、永久閉塞4, 6, 8時間の%含水量とほぼ一致した値を示した。

5. 組織学的所見

1) 永久閉塞群

2時間閉塞後灌流固定を行った症例で観察すると、虚血側の視床下核や基底核は海綿状になり、その領域内の毛細血管はうっ血して、赤血球を充満している。皮質の海綿状状態は軽度である。Virchow-Robin腔の拡張は虚血巣全体に顕著で、ことに基底核や視床下核の血管周囲には明らかな血漿の貯溜が見られた。神経細胞の核や細胞質の濃縮、空胞化、融解は虚血巣全体に広がっていたが、特に基底核や視床に著明であった。星状膠細胞の胞体の空胞化も著しい。虚血巣内への白血球の浸潤はない。非梗塞側半球には、神経細胞や膠細胞の変性、壊死、Virchow-Robin腔の拡張は認められなかった。

8時間虚血が持続すると、虚血巣内の海綿状状態は一層著しく、皮質にも著明となる。特に基底核や視床下核では、そのため脳組織の破壊も生じていた (Fig.



Fig. 6 Histological findings of the basal ganglia involved in infarction. Note that Virchow-Robin spaces dilate and the brain tissue is markedly destructed. Eight hours after embolization. HE stain. $\times 58$

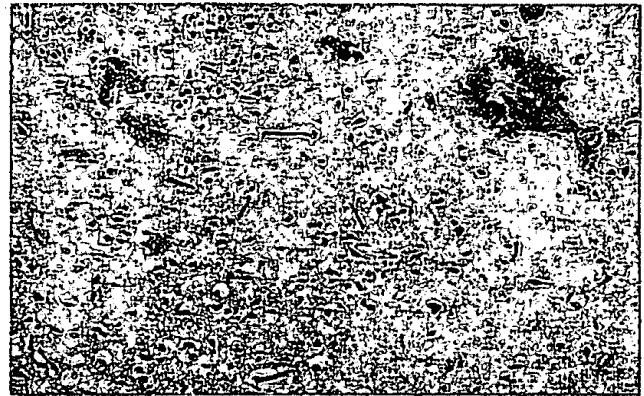


Fig. 7 Small hemorrhagic foci accompany congestive capillaries and leukocytic infiltration in the infarcted area. Two hours recirculation followed by embolization for 6 hours. HE stain. $\times 100$

6). 虚血巣内の血管に好中球が集まっているが、脳内への浸潤はない。

閉塞後24時間前後で死亡した動物では、梗塞巣の輪郭がより明瞭となり、梗塞巣内の脳組織の破壊が著しく、白血球の浸潤が軽度認められ、白血球の核片が梗塞巣内に散在していた。

2) 再開通群

6時間閉塞後再開通し、再開後1時間50分で死亡した動物では、脳組織の海綿状状態は、8時間閉塞群と同様に基底核、視床下核、皮質に著明で、その上、基底核や視床下核に毛細血管からの出血が加わり (Fig. 7), 梗塞巣には白血球が浸潤し始めていた。血流再開後1時間10分で死亡した動物では、浮腫の程度は前者とほぼ同様であったが、基底核、視床下核、さらに皮質にも毛細血管からの出血が生じていた。

3) 塞栓が挿入された動脈の変化

塞栓が挿入された動脈腔は軽度に拡張して、内弾性板は伸展していた。しかし、内弾性板の断裂はない。中膜に筋細胞の凝固壊死や出血が見られることがあった (Fig. 8), その起こり方は限局性で動脈壁全周に及ぶことはまれであった。内腔には偏心性に血栓が形成されていることがあったが、内腔を著しく狭窄することや閉塞していることはなかった。

考 察

1. 動物モデルの検討

虚血性脳浮腫と虚血巣への血流再開による浮腫の増悪の機序を解明するためには、適当な脳梗塞モデルが

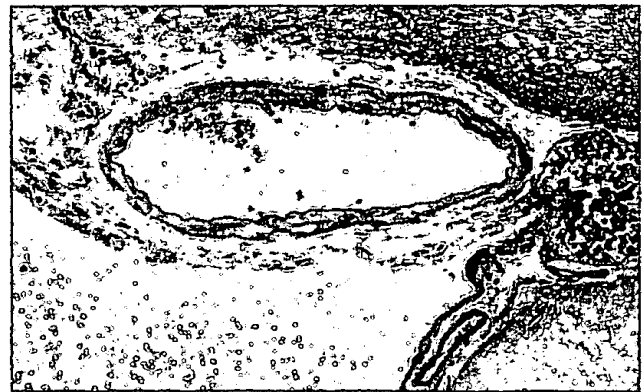


Fig. 8 Arterial changes received an embolus exhibit necroses of some medial smooth muscle cells and mild extent of medial hemorrhage. The lumen opens sufficiently without apparent thrombus formation. The specimen was taken from the same animal to Fig. 7. HE stain. $\times 162$

必要となる。われわれは、ラットの内頸動脈終末部、中大脳動脈起始部および後交通動脈起始部を塞栓で同時に閉塞することによって、内頸動脈穿通枝および中大脳動脈領域にほぼ一定した大きさの梗塞巣を作ることができた。

本梗塞モデルで一定の大きさの梗塞を作るためには、いくつかの点に留意しなければならない。①動物の供給源を一つにし、週齢ならびに体重をそろえること。同一種のラットを用い週齢ならびに体重をそろえても、供給源が異なる場合には血管径がやや異なる。

② 9~10週齢のSTD Wistar系ラットでは、直径

0.2~0.3mmの塞栓が適当である。これ以上の太さの塞栓を用いると、クモ膜下出血を多発し、あるいは塞栓が太すぎて破裂口でつかえ、先に送り込めないことが多い。③塞栓の直径のみならず長さもそろえること。塞栓は樹脂を糸に被覆して作るが、手作りであるため直径が不揃いになりやすい。そこで、塞栓の長さを十分にとることで、前・後交通動脈からの血流を十分に遮断するようにした。また、塞栓を挿入する時、塞栓の先端がA. pterygopalatina 起始部につかえて入らないことも経験されるが、これは手技に熟達することで十分に解決できる。

本モデルでは、塞栓の抜去により容易に血流を再開することができる。塞栓の挿入により、局所の動脈壁は傷害され、中膜筋細胞の部分的壊死、中膜への出血、内皮細胞の剝離による血栓形成が見られたが、血栓は偏心性で内腔を著しく狭窄するものではなかった。従って、塞栓除去後には、十分血流の再開は可能である。本モデルにおける塞栓抜去後の中大脳動脈への血流は、内頸動脈が起始部において結紮されているために前・後交通動脈を介して保たれるので、再開通時の中大脳動脈の血圧あるいは血流量が、患側の総頸・内頸動脈からの血流を保存した場合のそれと異なることが考えられる。今後、検討を要する問題である。

2. 脳主幹動脈閉塞による脳梗塞と血流再開

一般的にヒトでは、再開通を伴わない脳梗塞の患側半球の脳浮腫は第3病日にピークを有し、2週間以内に消失するものが大部分であるが、血流の再開通を生ずると脳浮腫は増強するのみならず、消失までに長時間を要し高頻度に出血性梗塞を合併するといわれている。従って、血流の再開は虚血性脳浮腫の増強因子として極めて重要である。河瀬ら⁹⁾は出血性梗塞には、急性期型(2~4病日)と亜急性期型(1週~1カ月)が存在し、前者では著名な脳浮腫を伴い症状の増悪をきたすが、後者ではこうした顕著な変化は少ないと述べているが、河瀬らも指摘しているように、血流の再開に伴われた出血性梗塞は前者であり、後者の発生機序は異なるので、両者を同時に論ずることはできない。病理解剖学的に、定型的な貧血性梗塞と定型的な出血性梗塞とは容易に区別し得るが、貧血性梗塞の急性期にも点状出血を伴うことが少なくない。その原因は、虚血巣内の血管(小細静脈のみならず毛細血管)の激しい透過性亢進と破綻で、これらの血管病変の発生機序には虚血や虚血によって局所的に形成される過酸化物が考えられる⁹⁾¹⁰⁾が、これらの説を確定化するには

なおいっそうの検討が必要である。

定型的な急性期の出血性梗塞では、白質の著明な水腫と灰白質(皮質、基底核、視床)に多数の点状ないし斑状出血を生じ、これが融合して様々な大きさの出血巣を形成している。出血は、類線維索性変性に陥った毛細血管からの漏出性出血を主体とし、小・細動脈からの破綻性出血が加わったものである。これらの漏出性または破綻性出血は、灰白質に好発し、白質に少ないのも特徴で、その差を生む原因も今後明らかにしなければならない大きな問題である。

従来、脳梗塞に対する治療は主に保存的にされていたが、microsurgeryの進歩に伴い脳血行再建術が積極的に行われるようになった。特に発症から極めて短時間に(2.5~6時間以内)に血流を再開させ出血性梗塞を防ぎ、神経脱落を最小限に食い止めようとする試みが活発になっている¹¹⁾。一般に疾病の治療を考える上で原因の除去は最も基本的な手段の一つであろう。従って、脳虚血の急性期に血流の再開を計ることは極めて当を得た考え方であると言わざるを得ない。しかし、問題は血流の再開によって血管透過性が著しく亢進し、著明な脳浮腫を招き個体を死に至らしめる危険が大きいことである。われわれの脳梗塞モデルにおいても、閉塞時間が1~2時間に限られるならば、血流の再開により脳梗塞は残ってもほとんどの動物を救命し得た。しかし、閉塞時間が3時間に及ぶと血流再開後24時間以内に動物は70%死亡し、6時間閉塞の場合には血流再開後4時間以内に100%死亡した¹²⁾。したがって、虚血時間が3時間以上に及ぶと、血管壁機能に重大な障害を生じることが想像される。

3. 麻酔の影響に対する考慮

本実験はpentobarbital sodium (nembutal 40mg/kg)腹腔内投与による麻酔下に行なわれたので、その影響を十分に考慮する必要がある。

本剤の薬理作用に関しては、中枢神経系の抑制作用が知られており¹³⁾、急激な投与により呼吸や循環の抑制から動物のとん死を招くことはしばしば経験されることであるが、最近、本剤に低酸素症性または虚血性脳障害に対する保護作用のあることが明らかになってきた。その作用機序は不明であるが、a) 頭蓋内圧の低下、b) 脳代謝の抑制、c) inverse steal 現象、d) free radicalの捕捉などがあげられている¹⁴⁾。

そこで、実験成績に対する本剤の影響を少なくするために、呼吸・循環系の抑制に対しては麻酔後30分以内に呼吸抑制が出現した動物あるいは麻酔後3時間以

内に覚醒しなかった動物を実験対象から除外することによって対処した。また、脳保護作用に対しては実験群、偽手術群のすべてに同様な麻酔を施し、少なくとも群間の成績における麻酔の影響を消去した。

おわりに

Wistar 系ラットを用いて、血流再開可能な急性期脳梗塞モデルの作製法について述べた。この方法により、側頭・頭頂葉、大脳基底核および視床下核の一部に広範な脳梗塞が形成され、また、血流の再開によって浮腫の明らかな増強が認められた。

本研究の一部は、文部省特定研究「神経難病」—第7班「虚血性脳浮腫の発生機序」研究費の補助によって行われた。

文 献

- 1) 吉田洋二, 小泉仁一: 脳内出血. ことに高血圧性脳内出血, 出血性脳梗塞, 脳動脈瘤, 脳動静脈奇形の血管病変を中心として. 脳神経 36: 831—840, 1984
- 2) Pulsinelli WA, Brierley JB: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. Stroke 10: 267—272, 1979
- 3) Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM: Focal cerebral ischemia in the rat: 1, Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metabol 1: 53—60, 1981
- 4) Coyle P: Middle cerebral artery occlusion in the young rat. Stroke 13: 855—859, 1982
- 5) Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N: An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. Stroke 13: 505—508, 1982
- 6) 吉本高志, 坂本哲也, 鈴木二郎: 実験的脳梗塞(第1報) —視床梗塞モデル犬の作製—. 脳外 6: 355—359, 1978
- 7) 柴田尚武: 虚血と血行再開—微小血管の形態および機能の変化—. 脳卒中 6: 94—97, 1984
- 8) 川瀬 武, 水上公宏, 田沢俊明ら: 出血性脳梗塞のCT所見とその出現機序. CT 研究 2: 283—290, 1980
- 9) 小暮久也, 望月 廣: 脳梗塞と脳代謝. 日医師会誌 88: 367—374, 1982
- 10) 浅野孝雄: 脳虚血に伴う膜脂質の変動—脳損傷の発現に関与するアラキドン酸代謝系路—. 脳神経 35: 41—50, 1983
- 11) 加川瑞夫: 脳虚血に対する外科治療の適応. 総合臨床 32: 2543—2547, 1983
- 12) 小泉仁一, 吉田洋二, 中沢貞二, 大根田玄寿: 未発表
- 13) Kawaue Y, Iriuchijima J: Changes in cardiac output and peripheral flow on pentobarbital anesthesia in the rat. Jpn J Physiol 34: 283—294, 1984
- 14) 浅野孝雄, 佐野圭司: 脳保護物質. 脳外 7: 549—558, 1979

Abstract**Experimental studies of ischemic brain edema****1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area**

Jin-ichi Koizumi, M.D.^{1),2)}, Yoji Yoshida, M.D.¹⁾, Teiji Nakazawa, M.D.¹⁾
and Genju Ooneda, M.D.³⁾

1) First Department of Pathology, Yamanashi Medical College

2) Department of Neurosurgery, Yamanashi Prefectural Central Hospital

3) Institute of Geriatrics

A new model of cerebral embolism in Wistar rats in which recirculation of the blood flow in ischemic areas can be introduced by means of removal of embolus in an easy way was designed. Large cerebral infarction in the territory of the right middle cerebral artery was induced by the embolization of a silicone rubber cylinder attached to a nylon surgical thread which was positioned at the segment where the right internal carotid artery branches into the middle cerebral artery. Recirculation in the ischemic area was performed successfully by removal of the cylinder by simply pulling thread out from the artery.

Influence of the recirculation on water contents and histological changes in the brains were investigated. Water contents in the brains increased from 77.62% in controls to 79.48% in the experimental group 12 hours after embolization. Recirculation for 2 hours after the various duration of ischemia enhanced the water contents significantly as compared to the brains receiving embolism for the same duration without recirculation. Reflow of the blood into the infarcted area resulted in increased vascular permeability leading to more severe edematous spongy changes in the brains and extravasation of erythrocytes and granulocytes from the small vessels in the infarcted area.

(Jpn. J. Stroke 8: 1-8, 1986)
